

Stofnaam	Theobromine
Type methode	vloeistofchromatografie
Te onderzoeken in	veevoeders en veevoedergrondstoffen
Minimum bepaalbaarheidsgrens	20 mg/kg
Herhaalbaarheid	
Reproduceerbaarheid (binnen laboratorium)	
Aantoonbaarheid	10 mg/kg
Categorie	D
Titel	Bepaling van theobromine in veevoeder(-grondstoffen). Afgeleid van AOAC Official Method 980.14 (1995): Theobromine and Caffeine in Cacao Products, Liquid Chromatographic Method 31.5.13, final action 1981, (1995)

## 1 Toepassing

Het voorschrift beschrijft de kwantitatieve methode voor de bepaling van theobromine in veevoeder (grondstoffen) m.b.v. vloeistofchromatografie. De aantoonbaarheidsgrens is 10 mg/kg, en de bepaalbaarheidsgrens is 20 mg/kg. Het UV-signaal is minimaal lineair tussen 0,2 en 50 mg theobromine/ml (overeenkomstig met 4 tot 1000 mg theobromine/kg). Bevestiging van de aanwezigheid van theobromine is mogelijk bij gehalten  $\geq 20$  mg/kg m.b.v. diode array spectrofotometrie. De analyse is afgeleid van AOAC Official Method 980.14(1995), (zie lit. ref. 12.1).

## 2 Definitie

Theobromine behoort tot de purine alkaloiden. Deze worden o.a. gebruikt bij de anti-astmatische medicatie. De verbindingen komen voor in cacaobonen, koffiebonen en thee. Theobromine komt voor op de dopinglijst voor paarden (maximaal toegestane hoeveelheid in urine is 2  $\mu\text{g/ml}$ ) De PVV norm voor theobromine in voer is 300 mg/kg. Het gehalte wordt uitgedrukt in mg/kg.

## 3 Beginsel

Het monster wordt ontvet met petroleumbenzine en vervolgens geëxtraheerd met heet water. Na zuivering over een C18 Solid Phase Extraction kolommetje, wordt theobromine gescheiden m.b.v. vloeistofchromatografie en gedetecteerd met UV-detectie.

## 4 Precisie

4.1 Herhaalbaarheid: nog niet bekend.

4.2 Reproduceerbaarheid: nog niet bekend.

4.3 Terugvindingspercentage: theobromine:  $99\% \pm 3\%$  bij een toevoeging van 100 mg/kg aan voeder.

## 5 Veiligheid

De normale veiligheidsmaatregelen in acht nemen.

## 6 Chemicaliën en reagentia

Alle chemicaliën dienen van analytische kwaliteit (p.a.) te zijn. Met water wordt bedoeld water gezuiverd met behulp van een milli Q installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm/cm. De chemicaliën kunnen vervangen worden door producten van andere leveranciers mits experimenteel is aangetoond dat deze producten van dezelfde of betere kwaliteit zijn.

### 6.1 Chemicaliën

6.1.1 Theobromine, Lot 38F0543 (feb. 1991), sigma T-4500

6.1.2 Kaliumdiwaterstoffosfaat p.a., Merck art. 04873

6.1.3 Ortho-fosforzuur 85% p.a., Merck art. 0573

6.1.4 Acetonitril HPLC, Biosolve cat. no.: 01200702

6.1.5 Petroleumbenzine, kooktraject 40 - 70°C, zeer zuiver,  
Lamers & Pleuger C-63000

6.1.6 Methanol HPLC, Biosolve cat. no. 13680602

6.1.7 Helium, Hoekloos art. nr. E550

## 6.2 Reagentia

6.2.1 Kaliumwaterstoffosfaat buffer 0,05M, pH 2,2 : weeg 6,8 g. kaliumdiwaterstoffosfaat (6.1.2) af in een 1000 ml bekglas en los op in ca. 900 ml water. Stel de pH op 2,2 met ortho-fosforzuur 85% (6.1.3). Breng dit over in een 1000 ml maatkolf en vul aan met water.

6.2.2 Seppak-eluens: meng 10 ml acetonitril (6.1.4) met 90 ml kaliumdiwaterstoffosfaat-buffer (6.2.1).

6.2.3 Mobiele fase: meng 50 ml acetonitril (6.1.4) met 950 ml kaliumdiwaterstoffosfaat-buffer (6.2.1) Voor gebruik ontgassen met helium (6.1.7).

6.2.4 Stamoplossing theobromine: weeg 25 mg theobromine (6.1.1), op 0,1 mg nauwkeurig, af in een 100 ml maatkolf. Vul aan met water. Voeg een roervlo toe en los de theobromine op onder roeren en verwarmen bij ca. 40°C (theobromine is slecht oplosbaar in koud water). Laat de stamoplossing afkoelen. Houdbaarheid: 3 weken bij 4°C en in het donker.

6.2.5 Standaard meetoplossing theobromine: pipetteer 2,0 ml theobromine stamoplossing (6.2.4) in een 100 ml maatkolf, voeg 10 ml acetonitril (6.1.4) toe en vul aan met kaliumdiwaterstoffosfaat-buffer (6.2.1).

## 7 Apparatuur, hulpmiddelen en glaswerk

De hieronder beschreven apparaten en hulpmiddelen mogen vervangen worden door andere merken mits van minimaal gelijkwaardige specificaties.

## 7.1 Apparatuur

- 7.1.1 Analytische balans, Mettler AE200
- 7.1.2 Bovenweger, Mettler PE360
- 7.1.3 pH-meter, PHM 82, Radiometer
- 7.1.4 Magneetroerder, Ikamag RCT, Janke & Kunkel
- 7.1.5 Centrifuge , Jouan CR 3-12, Braun scientific
- 7.1.6 Zwenk-schud machine, Edmund Buhler SM25A
- 7.1.7 Droogstoof, Termax T4075, Lamers laboratories
- 7.1.8 Waterbad 100<sup>0</sup>C, Lauda Thermostat, MB/58/12
- 7.1.9 Vacuüm manifold met 75 ml opzetstuk: Vac-elut, Analytichem International
- 7.1.10 HPLC-pomp, Merck Hitachi L-6200
- 7.1.11 Auto-injector, Perkin Elmer ISS-100
- 7.1.12 Voorkolom: Lichrocart, 4\*4 mm, RP-18, end-capped, 5 µm, Merck art. 50962
- 7.1.13 Kolom: Lichrocart, 250\*4 mm, Lichrospher 100, RP-18, 5 µm, Merck art. 50983
- 7.1.14 Detector: Waters 996 foto-diode array detector
- 7.1.15 Randapparatuur: Digital PC met millenium software van Waters 996 programmatuur

## 7.2 Hulpmiddelen

- 7.2.1 Verstelbare pipet, 1000 µl en 5000 µl, Gilson Pipetman
- 7.2.2 Centrifugebuizen polypropylene, 40 ml, Nalgene art. nr. 3110-0500
- 7.2.3 Trechters plastic
- 7.2.4 Seppak plus C18 kolommetjes, Waters nr. WAT 020515
- 7.2.5 Wegwerpspuitjes 2 en 5 ml, Sherwood 1100-502770
- 7.2.6 Filters Acrodisc PF 0,8 µm/0,2 µm, Gelman p/n 4187
- 7.2.7 HPLC monsterflesjes, Bester bv. BEVC11711-1
- 7.2.8 Doppen voor HPLC monsterflesjes, Chromacol Ltd PEPC3X

## 7.3 Glaswerk

Standaard laboratorium glaswerk.

## 8 Voorbehandeling van de monsters

De voeders(grondstoffen) worden voor de analyse gemalen op 1.0 mm en gehomogeniseerd.

## 9 Werkwijze

### 9.1 Algemeen

Monsters worden in duplo geanalyseerd. Neem bij elke serie monsters een blanco monster met toevoeging van theobromine mee voor het vaststellen van de analyse-recovery. Voor een toevoeging van 100 mg/kg, wordt 800 µl theobromine stamoplossing (6.1.3) toegevoegd. Na elke 4 monsterinjecties volgt een injectie van standaard meetoplossing.

### 9.2 Extractie

Weeg in tweevoud 1,0 g monster, op 1 mg nauwkeurig, af in een centrifugebuis van 40 ml (7.2.2). Voeg 30 ml petroleumbenzine (6.1.5) toe. Sluit de centrifugebuizen af en schud gedurende 30 minuten m.b.v. een zwenk-schud machine (7.1.6). Centrifugeer het verkregen extract gedurende 10 minuten bij 3000 rpm (7.1.5). Giet het supernatant af en herhaal de extractie nogmaals met 30 ml petroleumbenzine (6.1.5). Droog het residu 15 - 20 uur bij 60°C in een droogstoof (7.1.7). Breng het residu met ± 85 ml water over in een 300 ml erlenmeyer. Plaats de erlenmeyers met een glazen luchtkoeler in een kokend waterbad (7.1.8) en extraheer de theobromine gedurende 1 uur. Om de 10 minuten zwenken. Breng na afkoelen het gehele extract kwantitatief over in een 100 ml maatkolf, vul aan met water, meng en laat ± 10 min. staan.

### 9.3 Voorzuivering en concentrering

Behandel een seppak C18 kolommetje (7.2.4) voor door achtereen met 5 ml methanol (6.1.6) en met 5 ml water te elueren. Doorzuigen m.b.v. de vacuüm manifold (7.1.9). Het kolommetje mag niet droog lopen. Breng d.m.v. een volumepipet 25,0 ml extract op het seppak kolommetje m.b.v. het 75 ml opzetstuk. Doorzuigen m.b.v. de vacuüm manifold (7.1.9). Elueer de theobromine met ca. 4,5 ml seppak-eluens (6.2.2)(m.b.v. een 5 ml wegwerpspuit (7.2.5)), en vang het eluaat op in een 5 ml maatkolf. Vul de maatkolf aan met seppak-eluens (6.2.2) en meng. Filtreer een deel van het verkregen extract over een Acro-disc 0,8/0,2 µm filter (7.2.6) in een HPLC monsterflesje (7.2.7) m.b.v. een 2 ml wegwerpspuit (7.2.5).

### 9.4 Scheiding en detectie

Het extract wordt gescheiden m.b.v. hoge druk vloeistofchromatografie. Detectie vindt plaats met diode array spectrofotometrie (zie bijlage 2 t/m 5). Monsters die positief bevonden worden bij de chromatogram opname kunnen, als het gehalte ≥20 mg/kg is, bevestigd worden door het spectrum te karakteriseren.

#### HPLC-condities

mobiele fase	6.2.3
flow	1,0 ml/min.
voorkolom	7.1.12
kolom	7.1.13

injectievolume 50 µl  
runtijd autosampler 40 min.

Detectie (diode array)

golflengte chromatogram 274 nm.  
golflengte gebied 220-330 nm.  
runtijd chromatogram 40 min.

## 10 Berekening

M.b.v. de millennium software worden de piekoppervlakten en de retentietijd van theobromine in standaard- en monsteroplossingen bepaald. Het gehalte aan theobromine in de monsters wordt berekend met de volgende formule:

$$\text{gehalte (mg/kg)} = \frac{\text{Piekopp. mo.}}{\text{Piekopp. st.}} * C_{\text{st}} * \frac{V_{\text{extr}}}{V_{\text{sep}}} * \frac{V_{\text{el}}}{M_{\text{inweeg}}}$$

Piekopp. mo. = piekoppervlakte van de monsteroplossing  
Piekopp. st. = piekoppervlakte van de standaard meetoplossing  
 $C_{\text{st}}$  = concentratie van de standaard meetoplossing in µg/ml  
 $V_{\text{extr}}$  = volume (ml) van het waterextract (volgens voorschrift 100 ml)  
 $V_{\text{sep}}$  = volume (ml) wat is opgebracht op het seppak kolommetje (volgens voorschrift 25 ml)  
 $V_{\text{el}}$  = volume (ml) van het eluaat (volgens voorschrift 5 ml)  
 $M_{\text{inweeg}}$  = massa ingewogen monster in grammen

Door invoering van de concentratie van de standaard meetoplossing, het eindvolume en de inweeg in de millennium software, wordt dit gehalte m.b.v. de millennium software direkt berekend.

## 11 Beoordeling van de analyse uitslagen

De analyse moet opnieuw uitgevoerd worden wanneer bij duplo analyse, bij gehalten < 50 mg/kg, het verschil tussen de duplo's groter is dan 50% van de gemiddelde waarde van de duplo's. Bij gehalten ≥50 mg/kg mag het verschil tussen de duplo's niet groter zijn dan 20% van het gemiddelde.

### 11.1 Interpretatie van analyse uitslagen

- Monsters waarbij in het chromatogram geen piek aantoonbaar is, of een piek met een berekend gehalte < 10 mg/kg, worden als negatief beschouwd.
- Monsters met pieken in het chromatogram, met eenzelfde retentietijd (+/-0,2 min) als die van de dichtstbij geïnjecteerde zuivere standaard, met een berekend gehalte van ≥10 en < 20 mg/kg worden als verdacht beschouwd. De aanwezigheid van theobromine kan niet uitgesloten worden.
- Monsters met pieken in het chromatogram, met eenzelfde retentietijd (+/-0,2 min) als die van de dichtstbij geïnjecteerde zuivere standaard, met een berekend gehalte ≥20 mg/kg worden als positief beschouwd als de aanwezigheid van theobromine bevestigd kan worden m.b.v. diode array spectrofotometrie ( zie. 11.2 en bijlage 2 t/m 5). Als de aanwezigheid niet bevestigd kan worden, is er sprake van een fout positief resultaat.

### 11.2 Bevestiging van de aanwezigheid van theobromine m.b.v. diode array spectrofotometrie

- Bevestiging van de aanwezigheid van theobromine is mogelijk bij gehalten van  $\geq 20$  mg/kg m.b.v. diode array spectrofotometrie.
- Bevestiging van theobromine m.b.v. diode array spectrofotometrie vindt plaats m.b.v. een in de millennium software opgebouwde bibliotheek, waarbij het spectrum van het monster, wat positief is bevonden bij de vloeistof chromatografische analyse, vergeleken wordt met het spectrum van theobromine in de bibliotheek.
- De maximum absorptie golflengte in het UV-spectrum van de analyt moet gelijk (+/- 5 nm) zijn aan die van theobromine.
- Het spectrum van de analyt mag in het golflengtegebied van 230 - 330 nm, met een relatieve absorptie t.o.v. het maximum > 10%, visueel niet verschillen van het spectrum van theobromine. Aan dit criterium is voldaan, als dezelfde maxima aanwezig zijn en bij geen enkele golflengte in het boven genoemde bereik het verschil tussen de twee spectra groter is dan 10% van de absorptie van theobromine.

## 12 Literatuur

- 12.1 AOAC Official Method 980.14: Theobromine and Caffeine in Cacao Products, Liquid Chromatographic Method 31.5.13, Final Action 1981, (1995).

## 13 Bijlagen

- Bijlage 1: Millennium software instellingen voor de diode array detectie en dataverwerking
- Bijlage 2: Vloeistofchromatogram van theobromine standaard meetoplossing (2,056  $\mu\text{g/ml}$ )
- Bijlage 3: Vloeistofchromatogram van een voederextract met theobromine (22 mg/kg)
- Bijlage 4: Vloeistofchromatogram van een voederextract zonder theobromine (< 10 mg/kg)
- Bijlage 5: Vloeistofchromatogram van een voederextract met theobromine (102 mg/kg)

**Bijlage 1: Millennium software instellingen voor de diode array detectie en dataverwerking**

<b>Instrument Method: Inst_meth_theobromine</b> <i>Millenium v2.15</i> Date Printed: 11:13:57 AM, March 3, 1997
---

Method name: Inst\_meth\_theobromine  
Date Created: 03/03/97 11:13:57 AM

*Channel information*

Channel: 996	
Channel type	3D PDA
Channel name	996
Det. Units	AU
Description	

*Instrument Information*

Instrument type: PDA	
Instrument type	PDA
Instrument state	On
Start wavelength	220.0
End wavelength	330.0
Spec Resolution	2.4
Autoexposure	On
Exposure time	15.0
Interpolate 656	Yes
Sample Rate	1.0
Lamp on	Yes
Spectral filter	1
Use Analog One	Off
Use Analog Two	Off
Use events	Off
Ch1 Output Mode	Off
Ch1 Offset	0.000
Ch1 Output WL	254.0
Ch1 Output BW	4.8
Ch1 Ratio WL	254.0
Ch1 Ratio TH	0.001
Ch1 Low Ratio	0.001
Ch1 High Ratio	100.000
Ch1 Filter Type	Hamming
Ch1 Filt Resp	None
Ch2 Output Mode	Off
Ch2 Offset	0.000
Ch2 Output WL	254.0
	4.8
Ch2 Output BW	4.8
Ch1 Ratio WL	254.0
Ch1 Ratio TH	0.001
Ch1 Low Ratio	0.001
Ch1 High Ratio	100.000
Ch1 Filter Type	Hamming
Ch1 Filt Resp	None

**Bijlage 1: (Vervolg)**

<b>Method Set: Meth_theobromine</b> <i>Millenium v2.15</i> Date Printed: 11:13:40 AM, March 3, 1997
---

Method Set name: Meth\_theobromine  
Date Created: 12-SEP-96  
Instrument Method: Inst\_meth\_theobromine  
Processing Method: Proc\_theob  
Report Method:  
3D Blank Substraction

---

*Channel and Processing Information*

---

Channel:	Processing Method
Theob_274	Proc_theob

<b>Processing Method: Proc_theob</b> <i>Millenium v2.15</i> Date Printed: 11:12:01 AM, March 3, 1997
--

Method name: Proc\_theob  
Date Created: 03/03/97 11:11:31 AM  
Method Type: PDA

---

*Calibrtn Parameters*

---

Averaging: None  
RT Window 5.00  
Update RT Never  
CCalRefl

---

*Peak Integration Parameters*

---

Minimum Area 3000 uV\* sec  
Minimum Height 200 uV  
Treshold 6.000 uV/ sec  
Peak Width 50.00 sec

*Event table*

	Start (min)	Event	Stop (min)
1	0.000	Inhibit Integration	10.000
2	10.000	Valley-to-Valley	16.000
3	16.000	Inhibit Integration	40.000

*Component Table*

	Name	Retention Time (min)	RT Window (min)	Peak Match	Quant By	Fit Type	Weighting	Must Peak
1	Theobromine	7.475	0.374	Closest	Area	Linear	None	No

## Bijlage 1: (Vervolg)

### *Component Table*

	Default	Component Type
1	No	Single Peak

Tabel 'Timed Group Table' contains no data

Tabel 'Named Group Table' contains no data

### *PDA Parameters*

---

Start Wvln Limit	220.0 nm
End Wvln Limit	330.0 nm
Noise Start Time	0.50 min
Noise End time	1.00 min
SVG Derivative	0
SVG Smoothing	15
Purity Enabled	Yes
Peak Active Region	100.0
Treshold Criteria	Noise- Solvent
Solvent Angle	1.00 deg.
Purity Passes	1
Match Options	Search All
Match Library	
Treshold Criteria	Noise-Solvent
Solvent Angle	1.00 deg
Search threshold	10.00
Search depth	3
Ret Time Presearch	No
Ret Time Window	10.0 RT
Wvln. Presearch	No
Wacelength Window	5.0 nm

---

### *PDA Libraries*

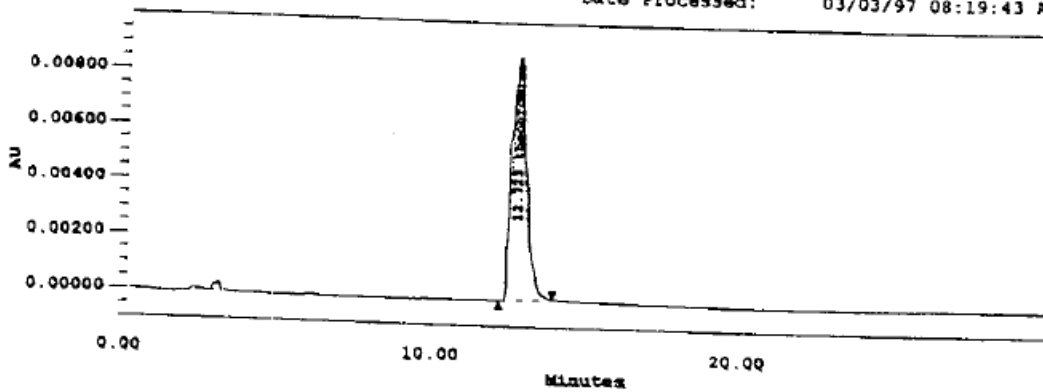
Bib\_theobromine

**Bijlage 2: Vloeistofchromatogram van theobromine standaard meetoplossing (2,056 µg/ml)**

Millennium Results Report		March 7, 1997	Page: 1 of 1
Report Method:	Rep_theobromine	Version:	2.15
Proc Chan:	theob_274	Channel Descr:	PDA 273.8 nm
Vial:	3	Date Processed:	03/03/97 08:19:43 AM

**Millennium Sample Information**

Project Name:	theobromine	Acq Meth Set:	Meth theobromine
Sample Name:	standaard	Date Acquired:	02/28/97 04:23:20 PM
Vial:	3	Sample Type:	Standard
Volume:	50.00000	Run Time:	40.0 min
Sample Weight:	1.00000	Dilution:	1.00000
Processing Method:	Proc_theob	Date Processed:	03/03/97 08:19:43 AM

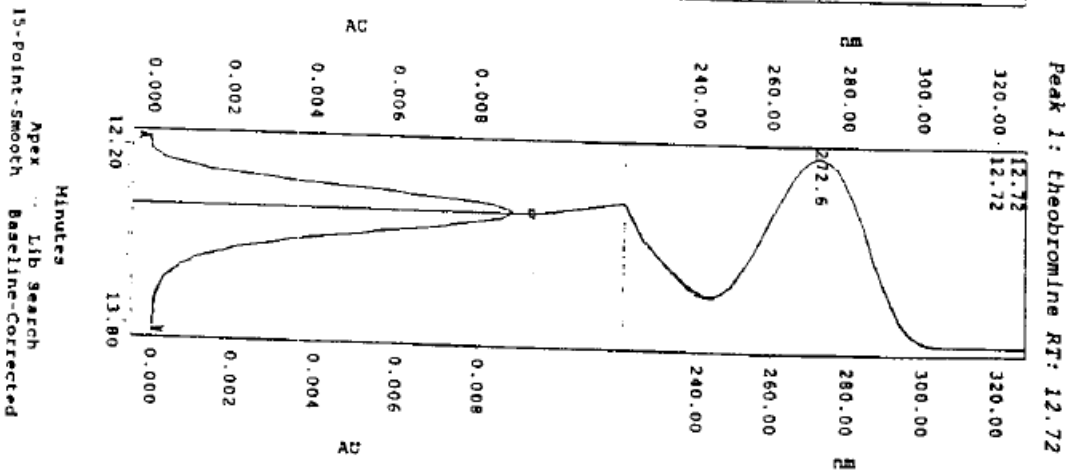


**Theobromine piek resultaten**

Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount (ug/ml)	Int Type
1 Theobromine	12.723	268716	8846	2.056	BB

**Theobromine PDA resultaten**

Ret. Time (min)	Purity: Angle	Purity Thresh.	Match: Angle	Match: Thresh.	Match: Spect. Name	Match: Lib. Name
1 12.723	0.307	1.29	0.27	1.27	theobromine	lib_theobromine

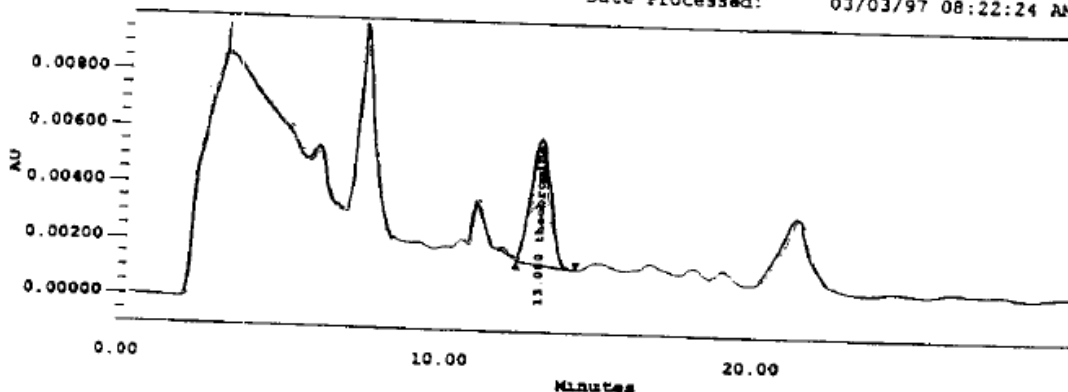


Bijlage 3: Vloeistofchromatogram van een voederextract met theobromine (22 mg/kg)

Millennium Results Report  
 Report Method: Rep\_theobromine  
 Proc Chan: theob\_274  
 Vial: 9  
 March 7, 1997  
 Version: 2.15  
 Channel Descr: PDA 273.8 nm  
 Date Processed: 03/03/97 08:22:24 AM  
 Page: 1 of 1

Millennium Sample Information

Project Name: theobromine  
 Sample Name: recov. 20 5  
 Vial: 9  
 Volume: 50.00000  
 Sample Weight: 1.02300  
 Processing Method: Proc\_theob  
 Acq Meth Set: Meth\_theobromine  
 Date Acquired: 02/28/97 08:29:15 PM  
 Sample Type: Unknown  
 Run Time: 40.0 min  
 Dilution: 20.00000  
 Date Processed: 03/03/97 08:22:24 AM

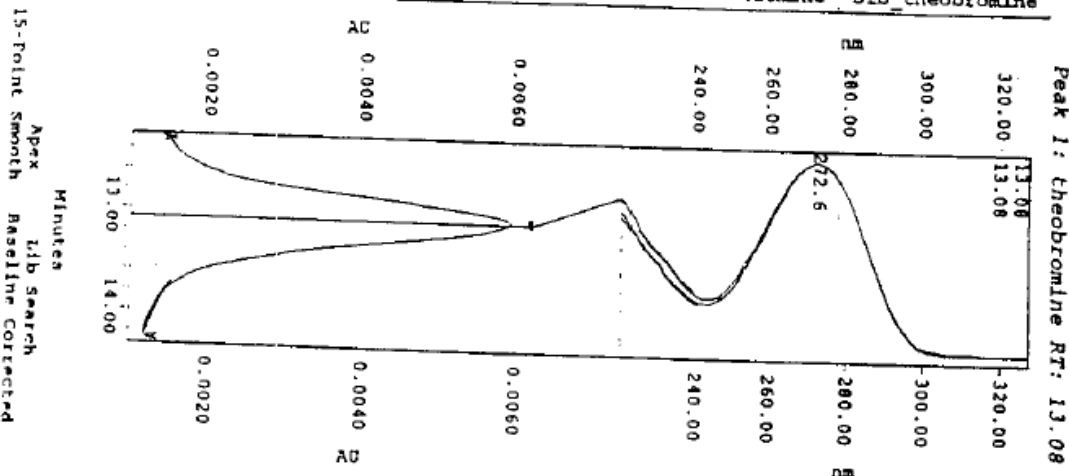


Theobromine piek resultaten

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount (mg/kg)	Int Type
1	theobromine	13.080	158711	4534	22.499	BB

Theobromine PDA resultaten

#	Ret. Time (min)	Purity Angle	Purity Thresh.	Match Angle	Match Thresh.	Match Spect. Name	Match Lib. Name
1	13.080	12.249	1.45	9.99	1.29	theobromine	lib_theobromine

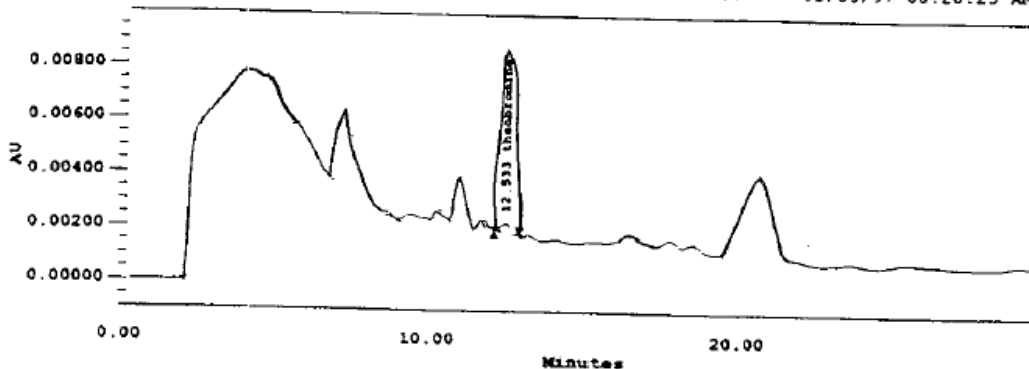


**Bijlage 4: Vloeistofchromatogram van een voederextract zonder theobromine (< 10 mg/kg)**

Millennium Results Report		March 7, 1997	Page: 1 of 1
Report Method:	Rep_theobromine	Version:	2.15
Proc Chan:	theob_074	Channel Descr:	PDA 273.8 nm
Vial:	4	Date Processed:	03/03/97 08:20:23 AM

Millennium Sample Information

Project Name:	theobromine	Acq Meth Set:	Meth_theobromine
Sample Name:	9700755-001 1	Date Acquired:	02/28/97 05:04:19 PM
Vial:	4	Sample Type:	Unknown
Volume:	50.00000	Run Time:	40.0 min
Sample Weight:	1.01700	Dilution:	20.00000
Processing Method:	Proc_theob	Date Processed:	03/03/97 08:20:23 AM

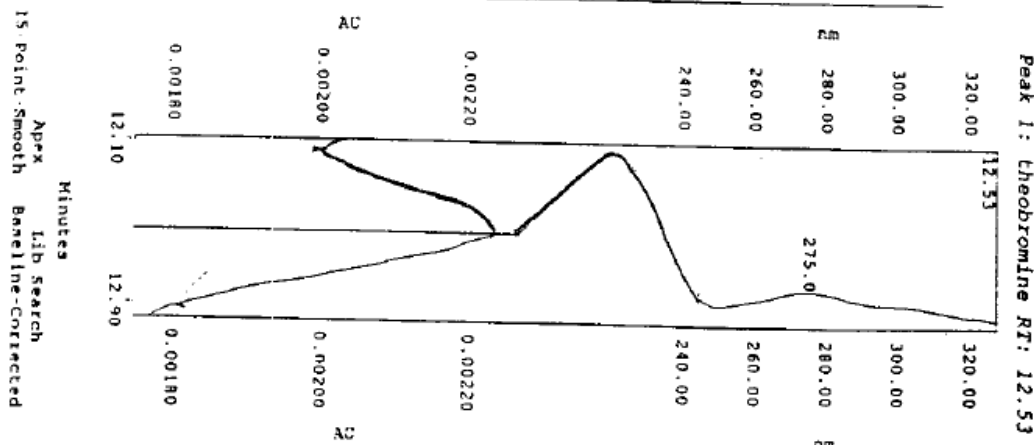


Theobromine piek resultaten

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount (mg/kg)	Int type
1	theobromine	12.533	9431	340	1.202	BB

Theobromine PDA resultaten

#	Ret. Time (min)	Purity Angle	Purity Thresh.	Match Angle	Match Thresh.	Match Spect. Name	Match Lib. Name
1	12.533	3.304	1.34				

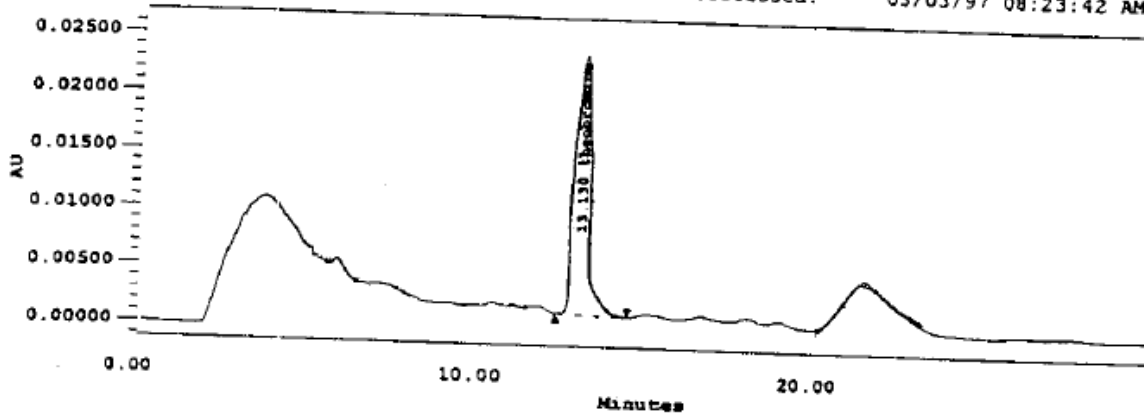


Bijlage 5: Vloeistofchromatogram van een voederextract met theobromine (102 mg/kg)

Millennium Results Report		March 7, 1997	Page: 1 of 1
Report Method:	Rep_theobromine	Version:	2.15
Proc Chan:	theob_274	Channel Descr:	PDA 273.8 nm
Vial:	11	Date Processed:	03/03/97 08:23:42 AM

Millennium Sample Information

Project Name:	theobromine	Acq Meth Set:	Meth_theobromine
Sample Name:	recov. 100 10	Date Acquired:	02/28/97 09:51:12 PM
Vial:	11	Sample Type:	Unknown
Volume:	50.00000	Run Time:	40.0 min
Sample Weight:	1.03500	Dilution:	20.00000
Processing Method:	Proc_theob	Date Processed:	03/03/97 08:23:42 AM



Theobromine piek resultaten

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount (mg/kg)	Int Type
1	theobromine	13.130	728119	22612	102.023	BB

Theobromine PDA resultaten

#	Ret. Time (min)	Purity1 Angle	Purity Thresh.	Match1 Angle	Match1 Thresh.	Match1 Spect. Name	Match1 Lib. Name
1	13.130	3.034	1.11	0.52	1.27	theobromine	lib_theobromine

